

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|--|---|----------------------------|---|
| (51) Classification internationale des brevets 6 : C07K 14/435, A01N 63/02, A61K 38/17 | | A2 | (11) Numéro de publication internationale: WO 97/30082 (43) Date de publication internationale: 21 août 1997 (21.08.97) |
| (21) Numéro de la demande internationale: | PCT/FR97/00295 | | (81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). |
| (22) Date de dépôt international: | 17 février 1997 (17.02.97) | | |
| (30) Données relatives à la priorité: | 96/02168 | 16 février 1996 (16.02.96) | FR |
| (71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR). | | Publiée | <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> |
| (72) Inventeurs; et | | | |
| (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR). HETRU, Charles [FR/FR]; 5, rue des Moineaux, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). SABATIER, Laurence [FR/FR]; 8, rue des Vergers, F-67120 Molsheim (FR). | | | |
| (74) Mandataire: | CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie - D.P.I., 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR). | | |

(54) Title: ANTIFUNGIC AND ANTIBACTERIAL PEPTIDE

(54) Titre: PEPTIDE ANTIBACTERIEL ET ANTIFONGIQUE

(57) Abstract

The invention discloses an antibacterial and antifungic peptide having the formula (I).

(57) Abrégé

Peptide antibactérien et antifongique de la formule (I) utilisable comme antibactérien et antifongique.



Peptide antibactérien et antifongique de la formule (I) utilisable comme antibactérien et antifongique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|-----------------------|
| AT | Arménie | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| AT | Autriche | GE | Géorgie | MX | Mexique |
| AU | Australie | GN | Guinée | NE | Niger |
| BB | Barbade | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | IT | Italie | PL | Pologne |
| BJ | Bénin | JP | Japon | PT | Portugal |
| BR | Brésil | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| BY | Bélarus | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CF | République centrafricaine | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CG | Congo | KZ | Kazakhstan | SG | Singapour |
| CI | Suisse | LJ | Liechtenstein | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LR | Liberia | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LT | Lithuanie | SZ | Swaziland |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | LV | Lettonie | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DK | Danemark | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| EE | Estonie | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | UG | Ouganda |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FR | France | MR | Mauritanie | UZ | Ouzbékistan |
| GA | Gabon | | | VN | Viet Nam |

Peptide antibactérien et antifongique

5

La présente invention a pour objet un nouveau peptide riche en protéines ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques, des compositions utilisables en agriculture et en thérapie humaine ou animale contenant ce peptide comme matière active. L'invention concerne également des procédés de traitement des plantes à l'aide de 10 ces compositions ainsi que des procédés de préparation de ce peptide.

On sait de longue date que les insectes présentent une résistance efficace contre les bactéries. Cette défense est pour une large part basée sur la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides. Cette défense est due à la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides à large spectre d'activité. Cette synthèse est induite par une blessure 15 septique ou par l'injection d'une faible dose de bactéries. Parmi les peptides antibactériens induits, les mieux caractérisés sont les cécropines et les défensines d'insectes. Plusieurs autres peptides antibactériens ont été partiellement caractérisés.

A côté de la classe des insectes peu de choses sont connues concernant d'autres arthropodes. Les scorpions sont des animaux plus anciens que les insectes au niveau 20 philogénique.

Il a maintenant été isolé, à partir d'une induction chez le scorpion *Androconus australis*, un peptide, qui présente des caractéristiques remarquables ainsi que des propriétés antibactériennes et antifongiques.

Plus particulièrement un premier aspect de l'invention concerne le peptide de 25 formule I:

Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys Ile Cys Arg

Arg

Arg

30 Tyr Pro Arg Asn Thr Cys Lys Tyr Tyr Cys Gly Gly

Dans la suite, la molécule de formule I sera appelée androctonine. Cette molécule, de taille réduite, comporte de 4 résidus cystéine engagés dans deux ponts intramoléculaires.

35 Un autre aspect de l'invention concerne un premier procédé pour l'obtention et l'isolement du peptide ci-dessus, qui est caractérisé en ce que successivement:

a) on prélève de l'hémolysme du scorpion *Androctonus australis* ;

- b) on effectue l'extraction par mise en contact d'hémolymph de *Androctonus australis* obtenue précédemment avec un milieu acide sous agitation, puis par centrifugation;
- c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés sur colonne séparatrice
- 5 d) on purifie les extraits.
- e) on caractérise le peptide.

10 L'hémolymph est prélevée par incision cuticulaire. Elle est recueillie dans un tube contenant un inhibiteur de protéase. Après centrifugation pour éliminer les cellules sanguines, le plasma est stocké à -30°C.

15 De manière préférée la seconde étape (extraction) on met en contact l'hémolymph de *Androctonus australis* avec un milieu acide, constitué d'une solution acide d'un acide (de pH de 2). La solution peut être une solution d'un acide minéral ou organique comme par exemple d'acide trifluoroacétique. L'extrait obtenu est ensuite centrifugé à froid à une vitesse de 30.000 g à 4°C, pendant 25 min.

20 De manière préférée la troisième étape (fractionnement), l'extrait est déposé sur une cartouche de phase inverse pour réaliser une extraction en phase solide. Le lavage des molécules solubles dans l'eau est effectué avec une solution acide diluée et l'élution des molécules hydrophobes avec un éluant approprié. On obtient de bons résultats avec de l'acide trifluoroacétique pour le lavage et un éluant contenant des quantités croissantes d'acetonitrile en solution acide diluée.

25 De manière préférée la quatrième étape (purification) est effectuée avec un éluant convenable qui peut être différent ou identique à celui de la phase précédente.

De manière préférée, dans la dernière étape (caractérisation), la nature du peptide est analysée selon la méthode de séquençage par dégradation d'Edman (*Acta Chemica Scandinavica* 10 (1956) p; 761-768). Selon cette méthode on obtient les structures suivantes:

30

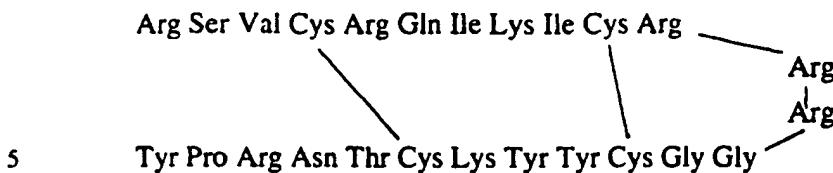
Arg Ser Val X Arg Gln Ile Lys Ile X Arg

Arg
|
Arg

Tyr Pro Arg Asn Thr X Lys Tyr Tyr X Gly Gly

35

Aucun signal n'était détectable dans les positions 4, 10, 16 et 20. (dégradation d'Edman). La présence de cystéines dans ces positions a été montrée par spectrométrie de masse, la structure alors obtenue étant la suivante:



Les masses mesurées de l'androctonine ci-dessus sont respectivement de:

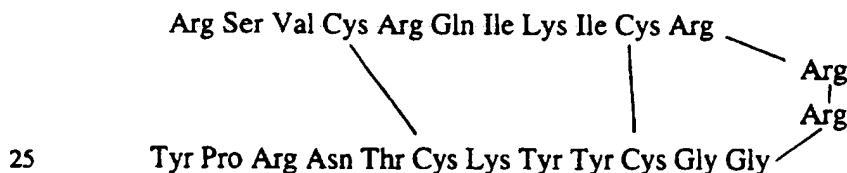
$3076,65 \pm 0,24$ Da;

Or les masses calculées sur la base des données de séquence sont respectivement
10 de: $3080,65 \pm 0,24$ Da;

Le défaut de masse correspond à la formation de deux pont disulfure intramoléculaires.

Afin d'établir la connectivité des ponts disulfure, la molécule a été clivée par une enzyme, l'endoprotéinase Lys-C, qui rompt la chaîne peptidique après la lysine. Les 15 peptides obtenus ont été isolés et la spectrométrie de masse a montré qu'il s'agissait de deux peptides liés par un pont disulfure. Les séquences déduites étaient Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys plus Cys Thr Asn Arg Asn Pro Tyr et Ile Cys Arg Arg Arg Gly Gly Cys Tyr Tyr.

La connectivité des ponts disulfure est ainsi établie et la cystéine 1 est liée à la 20 cystéine 4, la cystéine 2 à la cystéine 3. Ce résultat peut être schématisé ainsi:



Ces bonnes corrélations confirment les séquences proposées.

Les peptides selon l'invention peuvent également être obtenus sans difficulté selon 30 un second procédé, par synthèse chimique FMOC (Atherton and Sheppard R.C. (1989), Solid Phase Peptide Synthesis (IRL, Oxford, UK) suivie d'une renaturation dans une solution 100mM d'acétate d'ammonium à pH 8,5 pendant 24 h sous agitation à température ambiante. L'androctonine obtenue présente les mêmes propriétés chromatographiques que la molécule native et la connectivité des ponts disulfure est identique à celle de la molécule naturelle. La masse mesurée après renaturation (3076, 35 61 \pm 0,67) est très semblable à celle de la molécule native. La molécule synthétique présente la même activité antibactérienne que la molécule native sur la bactérie *Micrococcus luteus*.

L'ensemble des tests antibactériens et hémolytiques est réalisé avec la molécule synthétique.

1. L'androctonine ne présente aucun effet lytique sur des hématies de porc ou de boeuf.

5 2. Ces molécules ont des propriétés antibactériennes vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram négatif (cf tableau 1), des bactéries phytopathogènes et des champignons phytopathogènes.

10 Les exemples suivants illustrent l'obtention et les propriétés antibactériennes des peptides et des compositions selon l'invention.

Exemple 1: Isolement et caractérisation du peptide

on procède selon les étapes suivantes:

- extraction et de purification :

15 L'hémolymph (3,8 ml) est prélevée par incision de la cuticule. Elle est transférée dans un tube maintenu au froid en présence d'un inhibiteur de protéases (aprotinine) puis centrifugée à 30.000 g pendant 25 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est immédiatement soumis aux différentes étapes de la purification.

Fractionnement de l'extrait sur cartouches Sep-Pak C18

20 Après dépôt de l'extrait sur des cartouches Sep-Pak C18, les molécules à caractère hydrophile sont éliminées par un simple lavage par 5 ml d'eau acidifiée à l'acide trifluoacétique (TFA) à 0,05%.

L'élution des molécules hydrophobes est réalisée avec des solutions à 10, 40 et 80% d'acétonitrile en eau acidifiée (TFA 0,05%, 5 ml par cartouche).

25 Les fractions recueillies sont dénommées "Elution 10%", "Elution 40%" et "Elution 80%" et concentrées sous vide. Les fractions sont ensuite reconstituées avec de l'eau qualité HPLC avant l'analyse en HPLC.

*Purification par HPLC des molécules à activité antibactérienne
première étape:*

30 La fraction "Elution 40% est analysée sur une colonne de phase inverse Aquapore OD 300 C18 avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 52% dans l'eau acidifiée (TFA à 0,05%) en 90 minutes (soit une augmentation de 0,44% d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1 ml/min.

35 Les fractions actives résultantes sont ensuite purifiées sur une colonne "High Pressure Inert" (HPI) Delta Pak C18 (150*3,9 mm).

L'élution est réalisée dans un gradient linéaire biphasique d'acétonitrile de 2 à 11% dans l'eau acidifiée (HCl 6mM) en 10 minutes et de 11 à 21% en 50 min à un débit de 1 ml/min. La pureté de la fraction active est contrôlée par électrophorèse capillaire

avant la détermination de la séquence par dégradation d'Edman et analyse en spectrométrie de masse.

Exemple 2: Test *in vitro*: Mesure de l'activité antibactérienne par microspectrophotométrie

Pur chaque souche de bactérie utilisée (*E.coli* ; *M.luteus*) une colonne isolée est mise en suspension dans 10 ml de milieu PB (Poor Broth, milieu Luria Bertani dépourvu d'extrait de levure) DIFCO et incubée à 30°C pendant une nuit sous agitation lente.

Les bactéries à tester sont ramenées à une densité optique à 600 nm de 0,001 dans un milieu de culture frais. On dépose 10µl de chaque fraction dans des plaques de microtitration en présence de 100 µl de la suspension bactérienne. Au bout de 24 heures d'incubation à 25°C, on évalue la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de microtitration.

Dans ces conditions on observe une inhibition à 50% aux concentrations, exprimées en µM, indiquées dans le tableau suivant:

Tableau 1

| | Gram +/- | androctonin e MIC (µM) |
|----------------------------------|-------------|------------------------------|
| bactéries | | |
| <i>Micrococcus luteus</i> | + | 0,6-1,5 |
| <i>Aerococcus viridans</i> | + | 0,3-0,6 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | + | 1,5-3,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | 15-30 |
| <i>Clavibacter michiganensis</i> | + | 6-15 |
| <i>Escherichia coli D22</i> | - | >30 |
| <i>Escherichia coli D31</i> | - | 3-6 |
| <i>Escherichia coli 1106</i> | - | 6-15 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | - | 3-6 |

20

En utilisant le même protocole mais avec des bactéries phytopathogènes, on obtient les résultats suivants:

Tableau 2

| bactéries | androctonine MIC (μ M) |
|---|--------------------------------|
| <i>Clavibacter michiganensis</i> | 6-15 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | 0,5-1 |
| <i>Pseudomonas syringae pv syringae</i> | 15-22 |
| <i>Pseudomonas pisi</i> | 6-15 |
| <i>Pseudomonas maculicola</i> | 3-6 |
| <i>Pseudomonas valerianella</i> | 15-22 |
| <i>Pseudomonas syr phaseoli</i> | 2-4 |
| <i>Xanthomonas campestris pv campestris</i> | 3-6 |
| <i>Xanthomonas vesicatoria 687.3</i> | 1,5-3 |
| <i>Xanthomonas vesicatoria B229RI</i> | 1,5-3 |
| <i>Xanthomonas phaseolica</i> | 1-2 |

5 En utilisant le même protocole mais avec des champignons phytopathogènes, on obtient les résultats suivants:

Tableau 3

| champignons | androctonine MIC (μ M) | |
|----------------------------------|--------------------------------|-------|
| <i>Alternaria dauci</i> | 4,1-8,2 | 16-32 |
| <i>Stemphylium</i> | 4-8 | 16-32 |
| <i>Fusarium oxysporum L</i> | 2-4 | > 32 |
| <i>Verticillium torellis</i> | 2-4 | > 32 |
| <i>Botrytis petuniae</i> | 4-8 | > 32 |
| <i>Fusarium oxysporum meloni</i> | 2-4 | - |

10 * milieu supplémenté avec 1mM CaCl₂ et 20 mM KCl

Parmi les cultures pouvant faire l'objet d'un traitement antibactérien à l'aide d'un composé selon l'invention, on peut citer à titre d'exemples le riz, les céréales, notamment le blé et l'orge, ainsi que les plantes arboricoles, fruitières, légumières.

Parmi les cultures pouvant faire l'objet d'un traitement antifongiques à l'aide d'un composé selon l'invention, on peut citer, à titre d'exemples, les cucurbitacées, les cultures florales (pétunia), et les cultures maraîchères (carottes, tomates, choux).

5 Ces résultats montrent l'excellente activité antibactérienne du peptide selon l'invention, qui peut s'appliquer aux domaines humain, animal et végétal.

La présente invention a également pour objet des compositions, utilisables comme agents antibactériens, contenant comme matière(s) active(s) un (ou plusieurs) composé selon l'invention tel que décrit précédemment, en mélange avec les supports solides ou 10 liquides, acceptables en agriculture et les agents tensio-actifs également acceptables en agriculture. En particulier sont utilisables les supports inertes et usuels et les agents tensio-actifs usuels. Ces compositions recouvrent non seulement les compositions prêtes à être appliquées sur la culture à traiter au moyen d'un dispositif adapté, tel qu'un dispositif de pulvérisation, mais également les compositions concentrées commerciales 15 qui doivent être diluées avant application sur la culture.

20 Ces compositions peuvent contenir aussi toute sorte d'autres ingrédients tels que, par exemple, des colloïdes protecteurs, des adhésifs, des épaississants, des agents thixotropes, des agents de pénétration, des stabilisants, des séquestrants, etc... Plus généralement les composés utilisés dans l'invention peuvent être combinés à tous les additifs solides ou liquides correspondant aux techniques habituelles de la mise en 25 formulation.

D'une façon générale, les compositions selon l'invention contiennent habituellement de 0,05 à 95 % environ (en poids) d'un composé selon l'invention (appelé par la suite matière active), un ou plusieurs supports solides ou liquides et, 25 éventuellement, un ou plusieurs agents tensioactifs.

Par le terme "support", dans le présent exposé, on désigne une matière organique ou minérale, naturelle ou synthétique, avec laquelle le composé est combiné pour faciliter son application sur la plante, sur des graines ou sur le sol. Ce support est donc généralement inerte et il doit être acceptable en agriculture, notamment sur la plante 30 traitée. Le support peut être solide (argiles, silicates naturels ou synthétiques, silice, résines, cires, engrais solides, etc...) ou liquide (eau, alcools, notamment le butanol etc...).

35 L'agent tensioactif peut être un agent émulsionnant, dispersant ou mouillant de type ionique ou non ionique ou un mélange de tels agents tensioactifs. On peut citer par exemple des sels d'acides polyacryliques, des sels d'acides lignosulfoniques, des sels d'acides phénolsulfoniques ou naphtalènesulfoniques, des polycondensats d'oxyde d'éthylène sur des alcools gras ou sur des acides gras ou sur des amines grasses, des phénols substitués (notamment des alkylphénols ou des arylphénols), des sels d'esters

d'acides sulfosucciniques, des dérivés de la taurine (notamment des alkyltaurates), des esters phosphoriques d'alcools ou de phénols polyoxyéthylés, des esters d'acides gras et de polyols, les dérivés à fonction sulfates, sulfonates et phosphates des composés précédents. La présence d'au moins un agent tensioactif est généralement indispensable 5 lorsque le composé et/ou le support inerte ne sont pas solubles dans l'eau et que l'agent vecteur de l'application est l'eau.

Ainsi donc, les compositions à usage agricole selon l'invention peuvent contenir les matières actives selon l'invention dans de très larges limites, allant de 0,05 % à 95 % (en poids). Leur teneur en agent tensio-actif est avantageusement comprise entre 5 % et 10 40 % en poids.

Ces compositions selon l'invention sont elles-mêmes sous des formes assez diverses, solides ou liquides.

Comme formes de compositions solides, on peut citer les poudres pour poudrage (à teneur en composé pouvant aller jusqu'à 100 %) et les granulés, notamment ceux 15 obtenus par extrusion, par compactage, par imprégnation d'un support granulé, par granulation à partir d'une poudre (la teneur en composé dans ces granulés étant entre 0,5 et 80 % pour ces derniers cas), les comprimés ou tablettes effervescentes.

Le peptide selon l'invention peuvent encore être utilisés sous forme de poudres pour poudrage; on peut aussi utiliser une composition comprenant 50 g de matière 20 active et 950 g de talc; on peut aussi utiliser une composition comprenant 20 g de matière active, 10 g de silice finement divisée et 970 g de talc; on mélange et broie ces constituants et on applique le mélange par poudrage.

Comme formes de compositions liquides ou destinées à constituer des 25 compositions liquides lors de l'application, on peut citer les solutions, en particulier les concentrés solubles dans l'eau, les concentrés émulsionnables, les émulsions, les suspensions concentrées, les aérosols, les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser), les pâtes, les gels.

Les concentrés émulsionnables ou solubles comprennent le plus souvent 10 à 80 30 % de matière active, les émulsions ou solutions prêtes à l'application contenant, quant à elles, 0,001 à 20 % de matière active.

En plus du solvant, les concentrés émulsionnables peuvent contenir quand c'est nécessaire, 2 à 20 % d'additifs appropriés comme les stabilisants, les agents tensio-actifs, les agents de pénétration, les inhibiteurs de corrosion, les colorants ou les 35 adhésifs précédemment cités.

A partir de ces concentrés, on peut obtenir par dilution avec de l'eau des émulsions de toute concentration désirée, qui conviennent particulièrement à l'application sur les cultures.

A titre d'exemple, voici la composition de quelques concentrés émulsionnables :

Exemple CE 1 :

| | |
|--|----------------|
| - matière active | 400 g/l |
| - dodécylbenzène sulfonate alcalin | 24 g/l |
| - nonylphénol oxyéthylé à 10 molécules | |
| d'oxyde d'éthylène | 16 g/l |
| - cyclohexanone | 200 g/l |
| - solvant aromatique | q.s.p. 1 litre |

10

Selon une autre formule de concentré émulsionnable, on utilise :

Exemple CE 2

| | |
|---|-------|
| - matière active | 250 g |
| - huile végétale époxydée | 25 g |
| - mélange de sulfonate d'alcoylaryle et | |
| d'éther de polyglycol et d'alcools gras | 100 g |
| - diAndhylformamide | 50 g |
| - xylène | 575 g |

Les suspensions concentrées, également applicables en pulvérisation, sont préparées de manière à obtenir un produit fluide stable ne se déposant pas et elles contiennent habituellement de 10 à 75 % de matière active, de 0,5 à 15 % d'agents 25 tensioactifs, de 0,1 à 10 % d'agents thixotropes, de 0 à 10 % d'additifs appropriés, comme des anti-mousses, des inhibiteurs de corrosion, des stabilisants, des agents de pénétration et des adhésifs et, comme support, de l'eau ou un liquide organique dans lequel la matière active est peu ou pas soluble : certaines matières solides organiques ou des sels minéraux peuvent être dissous dans le support pour aider à empêcher la 30 sédimentation ou comme antigels pour l'eau.

A titre d'exemple, voici une composition de suspension concentrée :

Exemple SC 1 :

| | |
|---|-------|
| - matière active | 500 g |
| - phosphate de tristyrylphénol polyéthoxylé | 50 g |
| - alkylphénol polyéthoxylé | 50 g |
| - polycarboxylate de sodium | 20 g |

10

| | |
|--|---------|
| - éthylène glycol | 50 g |
| - huile organopolysiloxanique (antimousse) | 1 g |
| - polysaccharide | 1,5 g |
| - eau | 316,5 g |

5

Les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser) sont habituellement préparées de manière qu'elles contiennent 20 à 95 % de matière active, et elles contiennent habituellement, en plus du support solide, de 0 à 30 % d'un agent mouillant, de 3 à 20 % d'un agent dispersant, et, quand c'est nécessaire, de 0,1 à 10 % d'un ou plusieurs stabilisants et/ou autres additifs, comme des agents de pénétration, des adhésifs, ou des agents antimouillants, colorants, etc...

10 Pour obtenir les poudres à pulvériser ou poudres mouillables, on mélange intimement les matières actives dans les mélangeurs appropriés avec les substances additionnelles et on broie avec des moulins ou autres broyeurs appropriés. On obtient par là des poudres à pulvériser dont la mouillabilité et la mise en suspension sont avantageuses ; on peut les mettre en suspension avec de l'eau à toute concentration désirée et ces suspensions sont utilisables très avantageusement en particulier pour l'application sur les feuilles des végétaux.

15 A la place des poudres mouillables, on peut réaliser des pâtes. Les conditions et modalités de réalisation et d'utilisation de ces pâtes sont semblables à celles des poudres mouillables ou poudres à pulvériser.

20 A titre d'exemple, voici diverses compositions de poudres mouillables (ou poudres à pulvériser) :

25 Exemple PM 1

| | |
|---|-------|
| - matière active | 50% |
| - alcool gras éthoxylé (agent mouillant) | 2,5% |
| - phénylethylphénol éthoxylé (agent dispersant) | 5% |
| - craie (support inerte) | 42,5% |

30

Exemple PM 2 :

| | |
|---|--------------|
| - matière active | 10% |
| - alcool synthétique oxo de type ramifié, en C13 éthoxylé par 8 à 10 oxyde d'éthylène (agent mouillant) | 0,75% |
| - lignosulfonate de calcium neutre (agent dispersant) | 12% |
| - carbonate de calcium (charge inerte) | q.s.p. 100 % |

Exemple PM 3 :

Cette poudre mouillable contient les mêmes ingrédients que dans l'exemple précédent, dans les proportions ci-après :

| | | |
|---|--|-------------|
| 5 | - matière active | 75% |
| | - agent mouillant | 1,50% |
| | - agent dispersant | 8% |
| | - carbonate de calcium (charge inerte) | q.s.p. 100% |

Exemple PM 4 :

| | |
|---|-----|
| - matière active | 90% |
| - alcool gras éthoxylé (agent mouillant) | 4% |
| - phénylethylphénol éthoxylé (agent dispersant) | 6% |

Exemple PM 5 :

| | |
|---|-------|
| - matière active | 50% |
| - mélange de tensio-actifs anioniques et non ioniques (agent mouillant) | 2,5% |
| - lignosulfonate de sodium (agent dispersant) | 5% |
| 20 - argile kaolinique (support inerte) | 42,5% |

Les dispersions et émulsions aqueuses, par exemple les compositions obtenues en diluant à l'aide d'eau une poudre mouillable ou un concentré émulsionnable selon l'invention, sont comprises dans le cadre général de la présente invention. Les émulsions peuvent être du type eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau et elles peuvent avoir une consistance épaisse comme celle d'une "mayonnaise".

Les composés selon l'invention peuvent être formulés sous la forme de granulés dispersibles dans l'eau également compris dans le cadre de l'invention.

Ces granulés dispersibles, de densité apparente généralement comprise entre environ 0,3 et 0,6 ont une dimension de particules généralement comprise entre environ 150 et 2000 et de préférence entre 300 et 1500 microns.

La teneur en matière active de ces granulés est généralement comprise entre environ 1 % et 90 %, et de préférence entre 25 % et 90 %.

Le reste du granulé est essentiellement composé d'une charge solide et éventuellement d'adjuvants tensio-actifs conférant au granulé des propriétés de dispersibilité dans l'eau. Ces granulés peuvent être essentiellement de deux types distincts selon que la charge retenue est soluble ou non dans l'eau. Lorsque la charge est hydrosoluble, elle peut être minérale ou, de préférence, organique. On a obtenu

d'excellents résultats avec l'urée. Dans le cas d'une charge insoluble, celle-ci est de préférence minérale, comme par exemple le kaolin ou la bentonite. Elle est alors avantageusement accompagnée d'agents tensio-actifs (à raison de 2 à 20 % en poids du granulé) dont plus de la moitié est, par exemple, constituée par au moins un agent dispersant, essentiellement anionique, tel qu'un polynaphtalène sulfonate alcalin ou alcalino terreux ou un lignosulfonate alcalin ou alcalino-terreux, le reste étant constitué par des mouillants non ioniques ou anioniques tel qu'un alcoyl naphtalène sulfonate alcalin ou alcalino-terreux.

Par ailleurs, bien que cela ne soit pas indispensable, on peut ajouter d'autres 10 adjuvants tels que des agents anti-mousse.

Le granulé selon l'invention peut être préparé par mélange des ingrédients nécessaires puis granulation selon plusieurs techniques en soi connues (drageoir, lit fluide, atomiseur, extrusion, etc...). On termine généralement par un concassage suivi d'un tamisage à la dimension de particule choisie dans les limites mentionnées ci-dessus. On peut encore utiliser des granulés obtenus comme précédemment puis 15 imprégnés avec une composition contenant la matière active.

De préférence, il est obtenu par extrusion, en opérant comme indiqué dans les exemples ci-après.

20 Exemple GD1 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange 90 % en poids de matière active et 10 % d'urée en perles. Le mélange est ensuite broyé dans un broyeur à broches. On obtient une poudre que l'on humidifie avec environ 8 % en poids d'eau. La poudre humide est extrudée dans une extrudeuse à rouleau perforé. On obtient un granulé qui est séché, 25 puis concassé et tamisé, de façon à ne garder respectivement que les granulés d'une dimension comprise entre 150 et 2000 microns.

Exemple GD2 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange les constituants suivants :

| | | |
|----|---|-----|
| 30 | - matière active | 75% |
| | - agent mouillant (alkylnaphtalène sulfonate de sodium) | 2% |
| | - agent dispersant (polynaphtalène sulfonate de sodium) | 8% |
| | - charge inerte insoluble dans l'eau (kaolin) | 15% |

35 Ce mélange est granulé en lit fluide, en présence d'eau, puis séché, concassé et tamisé de manière à obtenir des granulés de dimension comprise entre 0,15 et 0,80 mm.

Ces granulés peuvent être utilisés seuls, en solution ou dispersion dans de l'eau de manière à obtenir la dose cherchée. Ils peuvent aussi être utilisés pour préparer des

associations avec d'autres matières actives, notamment antibactériens, ces dernières étant sous la forme de poudres mouillables, ou de granulés ou suspensions aqueuses.

En ce qui concerne les compositions adaptées au stockage et au transport, elles contiennent plus avantageusement de 0,5 à 95 % (en poids) de substance active.

5

L'invention concerne également un procédé pour le traitement antibactérien thérapeutique pour l'homme ou l'animal par administration d'une dose efficace du peptide selon l'invention, sous forme libre ou, le cas échéant, sous forme de sels d'addition avec un acide, de sels Andalliques ou de sels d'addition avec une base pharmaceutiquement acceptables, à l'état pur ou sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être administrés par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

10 Comme compositions solides pour administration orale peuvent être utilisés des comprimés, pilules, poudres (notamment dans des capsules de gélatine ou des cachets) ou granulés. Dans ces compositions, le produit actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres , par exemple un ou plusieurs lubrifiants tel que le stéarate de magnésium ou la talc, un colorant, un 20 enrobage(dragées) ou un vernis.

15 Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops, et des elixirs pharmaceutiquement acceptable contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent également comprendre des 25 substances autres, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants..

20 Les compositions stériles pour administration parentérale peuvent être de préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylène glycol, un 30 polyéthylène glycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de différentes façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par 35 chauffage. Elles peuvent également préparées sous forme de compositions solides stériles, qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans un milieu stérile injectable.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales, qui contiennent, outre le peptide actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylène glycols.

5 Les compositions stériles pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes, pomades, lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

En thérapeutique humaine, le peptide selon l'invention est particulièrement utile dans les traitements antibactériens. Les doses dépendent de l'effet recherché et de la durée du traitement; elles sont généralement comprises entre 50 et 1000 mg par jour par voie orale pour un adulte en une ou plusieurs périodes.

10 D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie qu'il estime la plus appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

Les exemples suivants sont donnés à titre non limitatif illustrent les compositions selon l'invention.

15 Exemple A:

On prépare, selon la technique habituelle, des comprimés dosés à 50 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

| | |
|---------------------------|-------|
| - peptide androctonine M1 | 50 mg |
| - amidon | 60 mg |
| - lactose | 50 mg |
| - stéarate de magnésium | 2 mg |

Exemple B:

On prépare une solution injectable contenant 20 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

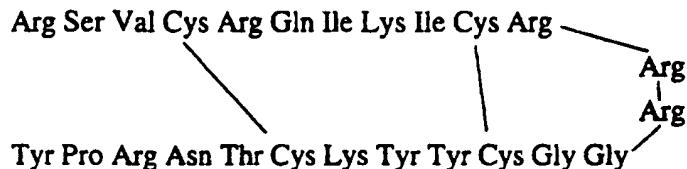
| | |
|----------------------------|--------------------------|
| - peptide androctonine M 2 | 22,4 mg |
| - eau distillée | q.s.p. 2 cm ³ |

REVENDICATIONS

5

1. Peptide de formule:

10



2. Composition antibactérienne, caractérisée en ce qu'elle contient comme matière active un peptide selon la revendication 1.

15

3. Composition selon la revendication 2, utilisable pour la protection des plantes contre les bactéries pathogènes.

20

4. Composition selon la revendication 2, utilisable pour le traitement thérapeutique du corps humain ou animal.

5. Composition antifongique, caractérisée en ce qu'elle contient comme matière active un peptide selon la revendication 1.

25

6. Composition selon la revendication 5, utilisable pour la protection des plantes contre les bactéries pathogènes.

7. Composition selon la revendication 5, utilisable pour le traitement thérapeutique du corps humain ou animal.

30

8. Procédé pour la protection des plantes contre les maladies bactériennes, caractérisé en ce qu'on applique, comme matière active, un peptide selon la revendication 1.

35

9. Procédé pour la protection des plantes contre les maladies fongiques, caractérisé en ce qu'on applique, comme matière active, un peptide selon la revendication 1.

10. Procédé de préparation du peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que, successivement:

- a) on prélève de l'hémolymphé du scorpion *Androctonus australis* ;
- b) on effectue l'extraction par mise en contact d'hémolymphé ou d'un broyat de *Androctonus australis* obtenues précédemment avec un milieu acide à neutre sous agitation, puis par centrifugation;
- 5 c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés, sur colonne séparatrice;
- d) on purifie les extraits;
- e) on effectue le séquençage.



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|---|---|----------------------------|---|
| (51) Classification internationale des brevets 6 : C07K 14/435, A01N 63/02, A61K 38/17 | | A3 | (11) Numéro de publication internationale: WO 97/30082 (43) Date de publication internationale: 21 août 1997 (21.08.97) |
| (21) Numéro de la demande internationale: | PCT/FR97/00295 | | (81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). |
| (22) Date de dépôt international: | 17 février 1997 (17.02.97) | | |
| (30) Données relatives à la priorité: | 96/02168 | 16 février 1996 (16.02.96) | FR |
| (71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR). | | | Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i> |
| (72) Inventeurs; et | | | |
| (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR). HETRU, Charles [FR/FR]; 5, rue des Moincaux, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). SABATTIER, Laurence [FR/FR]; 8, rue des Vergers, F-67120 Molsheim (FR). | | | (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 25 septembre 1997 (25.09.97) |
| (74) Mandataire: | CHRETTEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie - D.P.I., 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR). | | |

(54) Title: ANTIFUNGIC AND ANTIBACTERIAL PEPTIDE

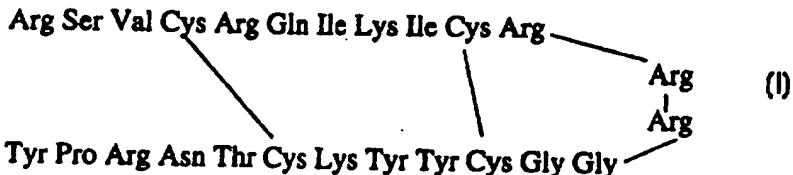
(54) Titre: PEPTIDE ANTIBACTERIEN ET ANTFONGIQUE

(57) Abstract

The invention discloses an antibacterial and antifungic peptide having the formula (I).

(57) Abrégé

Peptide antibactérien et antifongique de la formule (I), utilisable comme antibactérien et antifongique.



Tyr Pro Arg Asn Thr Cys Lys Tyr Tyr Cys Gly Gly

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Arménie | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| AT | Autriche | GE | Géorgie | MX | Mexique |
| AU | Australie | GN | Guinée | NE | Niger |
| BB | Barbade | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | IT | Italie | PL | Pologne |
| BJ | Bénin | JP | Japon | PT | Portugal |
| BR | Brésil | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| BY | Bélarus | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CF | République centrafricaine | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CG | Congo | KZ | Kazakhstan | SG | Singapour |
| CH | Suisse | LJ | Liechtenstein | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LR | Libéria | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LT | Lithuanie | SZ | Swaziland |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | LV | Lettonie | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DK | Danemark | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| EE | Estonie | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | UG | Ouganda |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FR | France | MR | Mauritanie | UZ | Ouzbékistan |
| GA | Gabon | | | VN | Viet Nam |

! National Application No
PCT/FR 97/00295

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/435 A01N63/02 A61K38/17 | | |
|---|--|---|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 194, no. 1, 15 July 1993, ORLANDO, FL US, pages 17-22, XP002018845 COCIANCICH E.A.: "Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins" see the whole document --- -/- | 1-10 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| <p>* Special categories of cited documents :</p> <ul style="list-style-type: none"> *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *'E' earlier document but published on or after the international filing date *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed <p>*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*'&' document member of the same patent family</p> | | |
| 1 | Date of the actual completion of the international search 31 July 1997 | Date of mailing of the international search report 07.08.97 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016 | | Authorized officer Groenendijk, M |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/FR 97/00295

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| P,X | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 47, 22 November 1996, MD US, pages 29537-29544, XP002036559 EHRET-SABATIER E.A.: "CHARACTERIZATION OF NOVEL CYSTEINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM SCORPION BLOOD" see the whole document ----- | 1-10 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

andé Internationale No
PCT/FR 97/00295

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K14/435 A01N63/02 A61K38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications vistées |
|-----------|--|--------------------------------|
| A | <p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 194, no. 1, 15 Juillet 1993, ORLANDO, FL US, pages 17-22, XP002018845 COCIANCICH E.A.: "Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins" voir le document en entier ---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p> | 1-10 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qui indique)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

1

| | |
|--|--|
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 31 Juillet 1997 | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 07.08.97 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016 | Fonctionnaire autorisé Groenendijk, M |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 97/00295

| C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|--|---|-------------------------------|
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| P,X | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 47, 22 Novembre 1996, MD US. pages 29537-29544, XP002036559 EHRET-SABATIER E.A.: "CHARACTERIZATION OF NOVEL CYSTEINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM SCORPION BLOOD" voir le document en entier ----- | 1-10 |